

DOI: 10.3969/j.issn.1000-3142.2014.03.017

洪森荣,尹明华,王艾平. 江西铅山红芽芋胚性愈伤组织的玻璃化法超低温保存及植株再生[J]. 广西植物,2014,34(3):375—380

Hong SR, Yin MH, Wang AP. Cryopreservation of Jiangxi Yanshan red bud taro (*Colocasia esculenta* var. *cormosus* cv. Hongyayu) embryogenic callus by vitrification and its plantlet regeneration[J]. *Guihaia*, 2014, 34(3):375—380

江西铅山红芽芋胚性愈伤组织的玻璃化法 超低温保存及植株再生

洪森荣, 尹明华*, 王艾平

(上饶师范学院 生命科学学院, 江西 上饶 334001)

摘要: 以江西铅山红芽芋胚性愈伤组织为材料,研究各种因素对其玻璃化法超低温保存的影响。结果表明:江西铅山红芽芋胚性愈伤组织玻璃化法超低温保存较佳的预培养条件为 $0.3 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 蔗糖预培养 3 d,较佳的 60% PVS2 装载时间为 20 min,较佳的 100% PVS2 脱水条件为 $25 \text{ }^\circ\text{C}$ 脱水 30 min,较佳的化冻温度为 $40 \text{ }^\circ\text{C}$,较佳的洗涤液蔗糖浓度为 $1.2 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$,较佳的冻后培养条件为暗培养 7 d 再转到光周期中培养。红芽芋胚性愈伤组织包埋玻璃化超低温保存后的平均成活率约为 70%。红芽芋胚性愈伤组织冻后再生苗没有发生形态学、生理学和细胞学的变异。

关键词: 江西铅山红芽芋; 胚性愈伤组织; 玻璃化法; 超低温保存; 植株再生

中图分类号: Q943.1 文献标识码: A 文章编号: 1000-3142(2014)03-0375-06

Cryopreservation of Jiangxi Yanshan red bud taro (*Colocasia esculenta* var. *cormosus* cv. Hongyayu) embryogenic callus by vitrification and its plantlet regeneration

HONG Sen-Rong, YIN Ming-Hua*, WANG Ai-Ping

(College of Life Sciences, Shangrao Normal University, Shangrao 334001, China)

Abstract: Using Jiangxi Yanshan red bud taro (*Colocasia esculenta* var. *cormosus* cv. Hongyayu) embryogenic calli as materials, the effects of various factors on its cryopreservation by vitrification were studied. The results showed that better preculture condition of Jiangxi Yanshan red bud taro embryogenic calli vitrification cryopreservation was $0.3 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ sucrose for 3 days. Better loading time was 60% PVS2 for 20 min. Better dehydration time of 100% PVS2 was 30 min at $25 \text{ }^\circ\text{C}$. Better thaw temperature was $40 \text{ }^\circ\text{C}$. Better sucrose concentration in washing media was $1.2 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$. Better culture condition after cryopreservation was dark culture for 7 d and then transferred to the photoperiod. The average survival rate of embryogenic calli after cryopreservation by vitrification amounted to about 70%. No significant difference was observed in the morphological, physiological and cytological indexes of plantlets coming from control and cryopreserved embryogenic calli.

Key words: Jiangxi Yanshan red bud taro (*Colocasia esculenta* var. *cormosus* cv. Hongyayu); embryogenic callus; vitrification; cryopreservation; plantlet regeneration

收稿日期: 2013-10-28 修回日期: 2013-12-03

基金项目: 江西省科技厅农业科技支撑计划项目(20122BBF60126); 江西省高等学校科技落地计划项目(KJLD13088)。

作者简介: 洪森荣(1974-),男,江西永新人,硕士,副教授,研究方向为植物组织培养,(E-mail) hongsenrong@163.com。

*通讯作者: 尹明华,硕士,副教授,研究方向为植物生物技术,(E-mail) yinminghua04@163.com。

红芽芋属天南星草本红芋,在江西省上饶市铅山县有悠久的栽培历史(肖月士,2006)。江西铅山县地处赣东北山区,温暖湿润的地理气候环境极其适合红芽芋的生长(李火金,2012)。江西铅山红芽芋肉白个大,煮熟后肉质细腻松滑,味甘可口,淀粉含量高,富含粗蛋白质和各种维生素,不但热销全国各地,而且远销日本、韩国、新加坡等,种植前景广阔(姜绍通等,2012;郑建平,2010)。目前,红芽芋生产上常采用种芋来保种,但田间繁殖易受气候、栽培条件及病虫害的影响,造成种芋感染病毒致使种质退化,甚至优良种质退化甚至消失(徐国环等,2008)。红芽芋试管苗的组织培养保存工作量大、费用高,继代培养易出现体细胞变异,不利于保持红芽芋种质资源的遗传稳定性,因此有必要探讨新的种质资源保存途径。

超低温保存是目前植物种质资源长期稳定保存的最好方法。近年来发展较快的玻璃化法超低温保存具有设备要求简单、材料处理步骤简便、重演性好、能长期稳定地保存种质等优点,已成功应用于许多园艺植物,如食用百合(张玉芹等,2004)、大蒜(王艳军等,2005)、怀山药(李明军等,2006)、怀地黄(李明军等,2008)等。体细胞胚胎发生是利用现代遗传操作方法对树木实施改良的重要平台技术,具有繁殖效率高,系数大,不受自然条件制约,可作为基因工程的受体系统等优点(王高等,2009),如果能用超低温技术来长期、稳定地保存遗传转化受体材料,将为红芽芋的细胞工程和基因工程操作带来很大的方便。目前有关红芽芋的研究多集中高产栽培和高效种植等技术(肖月士,2006;徐国环等,2008;郑建平,2010),而关于其超低温保存方面的研究未见报道。本文以江西铅山红芽芋胚性愈伤组织为试材,比较系统地研究了影响其玻璃化法超低温保存的各种因素,旨在为江西铅山红芽芋种质资源保存及实际应用奠定理论和技术基础。

1 材料与方 法

1.1 材 料

江西铅山红芽芋脱毒苗(由江西省江天农业科技有限公司提供)。

1.2 方 法

1.2.1 胚性愈伤组织诱导 将江西铅山红芽芋脱毒苗的球茎切成1~2 mm厚,分别接种到诱导培养基上。诱导培养基为MS+TDZ 2 mg·L⁻¹+2,4-D

1 mg·L⁻¹+30 g·L⁻¹蔗糖+7 g·L⁻¹琼脂,pH5.8~6.0。光照条件:黑暗;温度:(25±1)℃。60 d后,选取浅黄色果冻状的胚性愈伤组织继代2次,每次30 d,然后将其应用于江西铅山红芽芋玻璃化法超低温保存试验。

1.2.2 玻璃化法超低温保存程序 在无菌条件下,将约0.2 g的红芽芋胚性愈伤组织块转入MS+TDZ 2 mg·L⁻¹+NAA 1 mg·L⁻¹+7 g·L⁻¹琼脂+0~1.1 mol·L⁻¹蔗糖的培养基上,预培养0~6 d。预培养条件均为光照时间14 h·d⁻¹;光照强度1 000~2 000 lx;温度(25±1)℃。预培养后将红芽芋胚性愈伤组织块在(25±1)℃下转入60% PVS2(30%甘油+15%乙二醇+15% DMSO+0.4 mol·L⁻¹蔗糖,pH 5.8)中装载0~60 min。装载后,用100% PVS2在0℃或25℃下分别对红芽芋胚性愈伤组织块进行脱水0~60 min。脱水后,红芽芋胚性愈伤组织块转入冷冻管中,更换新的PVS2,然后将冻存管迅速置于液氮中保存1 d。从液氮中取出冷冻管,分别放入温度为25、30、40或45℃的水浴中分别化冻3 min。化冻后,红芽芋胚性愈伤组织块在(25±1)℃下用MS+TDZ 2 mg·L⁻¹+NAA 1 mg·L⁻¹+0~1.6 mol·L⁻¹蔗糖的液体培养基洗涤3次,每次10分钟。

1.2.3 胚性愈伤组织再培养及成活率检测 先将洗涤后的红芽芋胚性愈伤组织块转入分化培养基(MS+TDZ 2 mg·L⁻¹+NAA 1 mg·L⁻¹+30 g·L⁻¹蔗糖+7 g·L⁻¹琼脂)中,然后置于两种培养条件下进行恢复培养。一种培养条件是将洗涤后的红芽芋胚性愈伤组织块直接置于光周期中培养,光照时间为14 h·d⁻¹;光照强度为1 000~2 000 lx;温度为(25±1)℃;另一种培养条件是先将洗涤后的红芽芋胚性愈伤组织块暗培养7 d,温度为(25±1)℃,再转到光周期中培养,光照时间14 h·d⁻¹;光照强度为1 000~2 000 lx;温度为(25±1)℃。60 d统计成活率及恢复生长的时间。红芽芋胚性愈伤组织块的成活以其能分化出胚状体为标志。成活率=(超低温保存后胚性愈伤组织分化出胚状体的块数/超低温保存后胚性愈伤组织的总块数)×100。

1.2.4 超低温保存后胚性愈伤组织再生苗的形态学、生理学和细胞学检测 将超低温保存后的红芽芋胚性愈伤组织块以及未进行超低温保存处理的红芽芋胚性愈伤组织块(CK)同时接入分化培养基(MS+TDZ 2 mg·L⁻¹+NAA 1 mg·L⁻¹+30 g·L⁻¹蔗糖

+7 g · L⁻¹琼脂)上,30 d 后将分化出的胚状体再次转入分化培养基(MS+TDZ 2 mg · L⁻¹+NAA 1 mg · L⁻¹+30 g · L⁻¹蔗糖+7 g · L⁻¹琼脂)上,60 d 形成完整植株后对以上两种再生苗进行形态学、生理学和细胞学检测。形态学检测指标有株高、芽数、根数、根长等。生理学检测指标包括叶绿素含量、可溶性蛋白含量、可溶性总糖含量。测定方法参考程昕昕等(2013)的方法。细胞学检测采用染色体数目测定与观察的方法(孔红,2012)。

1.2.5 统计方法 以上实验均重复 3 次,本实验所有数据表示为 Mean±SD,由于统计各处理的细胞活力和成活率时发现多数实验数据不在 30%~70% 范围内,为提高显著性检验的精确度,对其进行反正弦转换,然后用 SPSS19.0 软件进行 One-Way ANOVA 分析,再进行 LSD 法检验, $P < 0.05$ 为有统计学差异显著性。

2 结果与分析

2.1 预培养对红芽芋胚性愈伤组织玻璃化法超低温保存的影响

从表 1 可知,在预培养时间一定(3 d)时,预培养基中蔗糖浓度对江西铅山红芽芋胚性愈伤组织玻璃化法超低温保存后的成活率具有显著的影响,其中使用 0.3 mol · L⁻¹蔗糖进行预培养,获得的成活率最高,低于或高于 0.3 mol · L⁻¹的蔗糖浓度均会造成成活率的下降。从表 1 还可知,在蔗糖浓度一定(0.3 mol · L⁻¹)时,预培养时间对江西铅山红芽芋胚性愈伤组织玻璃化法超低温保存后的成活率也具有显著的影响,其中预培养 3 d 获得的成活率最高,短于或长于 3 d 的预培养时间均会造成成活率的下降。因此,0.3 mol · L⁻¹蔗糖预培养 3 d 用于以下超低温保存实验。

2.2 装载对红芽芋胚性愈伤组织玻璃化法超低温保存的影响

从表 2 可知,用 60% 的 PVS2 对红芽芋胚性愈伤组织进行装载可以显著提高其成活率,但当装载时间为 20 min 时,红芽芋胚性愈伤组织的冻后成活率开始显著下降。因此,江西铅山红芽芋胚性愈伤组织合适的装载时间为 20 min。

2.3 脱水对红芽芋胚性愈伤组织玻璃化法超低温保存的影响

从表 3 可知,用 60%PVS2 装载后,再用 100%

表 1 预培养对江西铅山红芽芋胚性愈伤组织玻璃化法超低温保存的影响

Table 1 Effect of preculture on the cryopreservation of Jiangxi Yanshan red bud taro embryogenic callus by vitrification

蔗糖浓度 Sucrose concentration (mol · L ⁻¹)	成活率 Survival rate (%)	预培养时间 Preculture time (d)	成活率 Survival rate (%)
0	36.4±6.3eE	0	32.5±4.3dD
0.1	56.9±5.6bcC	1	56.9±6.2bB
0.3	73.4±4.9aA	2	62.1±4.9bB
0.5	63.2±4.2bB	3	72.9±5.5aA
0.7	51.4±4.5cC	4	59.4±8.6bB
0.9	43.9±9.4dD	5	52.4±6.1cC
1.1	41.5±8.4dD	6	48.7±7.6cC

注:同一列中大、小写字母分别表示在 0.01 和 0.05 水平上的差异性,下同。
Note: The capital and small letters in the same volume stand for the significance on 0.01 and 0.05 level, the same as below.

表 2 装载对江西铅山红芽芋胚性愈伤组织玻璃化法超低温保存的影响

Table 2 Effect of loading on the cryopreservation of Jiangxi Yanshan red bud taro embryogenic callus by vitrification

60%PVS2 装载时间 Loading time with PVS2 (min)	成活率 Survival rate (%)
0	24.9±5.1fF
10	61.3±4.4bB
20	70.4±6.3aA
30	62.8±6.9bB
40	53.4±8.5cC
50	42.9±5.2dD
60	33.5±6.4eE

表 3 脱水对江西铅山红芽芋胚性愈伤组织玻璃化法超低温保存的影响

Table 3 Effect of dehydration on the cryopreservation of Jiangxi Yanshan red bud taro embryogenic callus by vitrification

0℃脱水时间 Dehydration time at 0℃ (min)	成活率 Survival rate (%)	25℃脱水时间 Dehydration time at 25℃ (min)	成活率 Survival rate (%)
0	0±0eD	0	0±0eE
10	36.4±6.3dC	10	34.8±4.9dD
20	41.6±6.5cC	20	59.6±6.8bB
30	43.9±5.2cC	30	74.3±6.2aA
40	52.4±8.4bB	40	62.8±7.5bB
50	65.9±8.2aA	50	56.3±9.6bB
60	54.4±7.6bB	60	43.9±8.3cC

PVS2 对红芽芋胚性愈伤组织进行脱水同样十分重要。在 25℃时,适宜的脱水时间为 30 min。在 0℃时,适宜的脱水时间为 50 min。由于 25℃脱水 30

min 的成活率显著大于 0 °C 脱水 50 min 的成活率, 因此, 在红芽芋胚性愈伤组织玻璃化法超低温保存中, 适宜的脱水条件为 PVS2 在 25 °C 脱水 30 min。

2.4 化冻对红芽芋胚性愈伤组织玻璃化法超低温保存的影响

从表 4 可知, 40 °C 的水浴快速化冻有利于提高红芽芋胚性愈伤组织玻璃化法超低温保存后的成活率。低于或高于 40 °C 的水浴快速均会显著降低其成活率。因此, 江西铅山红芽芋胚性愈伤组织玻璃化法超低温保存的适宜化冻温度为 40 °C。

表 4 化冻对江西铅山红芽芋胚性愈伤组织玻璃化法超低温保存的影响

Table 4 Effect of thawing on the cryopreservation of Jiangxi Yanshan red bud taro embryogenic callus by vitrification

化冻温度 Thawing temperature (°C)	成活率 Survival rate (%)
25	68.5±8.5bB
30	70.6±6.9bB
40	75.5±5.2aA
45	62.3±4.8cC

2.5 洗涤对红芽芋胚性愈伤组织玻璃化法超低温保存的影响

从表 5 可知, 不洗涤直接培养, 红芽芋胚性愈伤组织的成活率较低, 而用 0~1.6 mol·L⁻¹ 蔗糖洗涤后, 红芽芋胚性愈伤组织的成活率显著提高。其中 1.2 mol·L⁻¹ 的蔗糖洗涤后获得的成活率最高。因此, 红芽芋胚性愈伤组织在玻璃化法超低温保存后, 应该用 MS+1.2 mol·L⁻¹ 的蔗糖溶液洗涤 3 次, 每次 10 min, 成活率可达 68.4%。

表 5 洗涤对江西铅山红芽芋胚性愈伤组织玻璃化法超低温保存的影响

Table 5 Effect of washing on the cryopreservation of Jiangxi Yanshan red bud taro embryogenic callus by vitrification

洗涤培养基中蔗糖浓度 (mol·L ⁻¹) Sucrose concentration in washing medium	成活率 (%) Survival rate
0	52.4±6.8cC
0.4	56.2±6.4cC
0.8	61.5±5.2bB
1.2	68.4±9.5aA
1.6	63.9±8.1bB

2.6 冻后培养条件对红芽芋胚性愈伤组织玻璃化法超低温保存的影响

从表 6 可知, 暗培养 7 d 再转到光周期中培养有利于提高红芽芋胚性愈伤组织的冻后成活率。

表 6 冻后培养条件对江西铅山红芽芋胚性愈伤组织玻璃化法超低温保存的影响

Table 6 Effect of culture condition after freezing on the cryopreservation of Jiangxi Yanshan red bud taro embryogenic callus by vitrification

冻后培养条件 Culture condition after freezing	成活率 (%) Survival rate
直接在光周期下培养 Direct culture in photoperiod	62.4±8.1bB
暗培养 7d 后转入光周期下培养 Firstly culture in dark for 7d then in photoperiod	75.6±5.9aA

2.7 冻后胚性愈伤组织再生苗的形态学、生理学和细胞学检测

从表 7 可知, 红芽芋胚性愈伤组织冻后再生苗与未冻后再生苗在形态指标和生理指标上均未有显著性差异 ($P>0.05$)。同时, 细胞学检测表明, 红芽芋胚性愈伤组织冻后再生苗的染色体数目没有发生变化。因此, 用玻璃化法对江西铅山红芽芋胚性愈伤组织进行超低温保存是可靠的。

表 7 玻璃化法超低温保存后江西铅山红芽芋胚性愈伤组织再生苗的形态学和生理学检测

Table 7 Morphological and physiological detection of regeneration plantlets of Jiangxi Yanshan red bud taro embryogenic callus after cryopreservation by vitrification

形态学和生理学检测 Morphological and physiological indexes	常温胚性愈伤组织再生苗 Embryogenic callus regeneration plantlet without cryopreservation	冻后胚性愈伤组织再生苗 Embryogenic callus regeneration plantlet after cryopreservation
平均株高 (cm) Average plantlet height	6.5±1.3aA	6.8±1.1aA
平均芽数 (个) Average bud number	3.9±0.6aA	3.5±0.8aA
平均根数 (条) Average root number	5.5±1.2aA	5.1±1.4aA
平均根长 (cm) Average root length	4.6±1.4aA	4.8±1.5aA
总叶绿素含量 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ Total chlorophyll content	1.664±0.336aA	1.542±0.258aA
可溶性蛋白含量 ($\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$) The content of soluble protein	0.724±0.149aA	0.852±0.191aA
可溶性总糖含量 ($\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$) The total soluble sugar content	0.619±0.164aA	0.724±0.139aA
POD 活性 ($\text{U}\cdot\text{g}^{-1}$) The activity of POD	0.862±0.157aA	0.892±0.162aA
SOD 活性 ($\text{U}\cdot\text{g}^{-1}$) The activity of SOD	142.3±21.6aA	136.7±36.8aA

注: 同一行中大、小写字母分别表示在 0.01 和 0.05 水平上的差异性
Note: The capital and small letters in the same line stand for the signification on 0.01 and 0.05 level.

3 讨论与结论

预培养是玻璃化法低温保存程序中的第一步。

预培养一般采用高渗溶液(如高浓度的蔗糖、山梨醇、二甲亚砜)培养一定的时间。高渗预处理可增加细胞外渗透势,加速植物材料细胞内的水流到细胞外以减少其含水量,增加组织中可溶性糖等保护性物质的含量,进而避免快速冷冻时细胞内结冰而对细胞造成的损伤,使细胞能经受超低温胁迫(Hong *et al.*, 2012a)。用高浓度的蔗糖进行预培养是较为常用的方法。匍匐翦股颖胚性愈伤组织玻璃化法低温保存的适宜蔗糖浓度为 $0.3 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$,适宜的预培养时间为 5 d(李红民等, 2009)。在本研究中,江西铅山红芽芋胚性愈伤组织玻璃化法低温保存的适宜蔗糖浓度为 $0.3 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$,适宜的预培养时间为 3 d。

在用 PVS2 脱水之前进行一定时间的装载有利于存活率的提高,是玻璃化法超低温保存的一个必要步骤。PVS2 组分都是由含经基化合物按照不同比例的渗透性物质和非渗透性物质组成,通过适度降低细胞含水量以更好地避免细胞内冰晶的生成。装载预处理可初步降低组织的含水量,避免由于渗透压变化太强而对材料造成伤害(Hong *et al.*, 2012a)。瓯柑(陈勇等, 2004)、龙眼(郭玉琼等, 2006)和荔枝(郭玉琼等, 2007)胚性愈伤组织于常温下用 60% PVS2 分别装载 20、30 和 20 min 后,均可显著提高其细胞存活率。本实验结果与此相类似。

装载之后,需要再用 PVS2 在 $25 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 或 $0 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 下对材料进行一定时间脱水,使组织脱去水分并缓和地渗入组织,在冻存中进入玻璃化状态,减轻在超低温保存过程中细胞所受的伤害。不同基因型的材料, PVS2 处理的温度和时间也不一样(Guzmán-García *et al.*, 2013)。瓯柑(陈勇等, 2004)和荔枝(郭玉琼等, 2007)胚性愈伤组织的 PVS2 处理温度和时间分别为 $0 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 和 40 min。玉米胚性愈伤组织的 PVS2 处理温度和时间分别为 $25 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 和 120 min(周小梅等, 2001)。本实验结果与此相类似,江西铅山红芽芋胚性愈伤组织的 PVS2 处理温度和时间分别为 $25 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 和 30 min。

在玻璃化法超低温保存后,解冻方式就显得十分重要。采用适宜的解冻方法才能避免在解冻时再结冰或渗透冲击引起细胞膜体系的破坏(Maslanka *et al.*, 2013)。瓯柑(陈勇等, 2004)、欧洲七叶树(Lambardi *et al.*, 2005)、龙眼(郭玉琼等, 2006)和荔枝(郭玉琼等, 2007)胚性愈伤组织玻璃化法超低温保存后适宜的解冻温度均为 $40 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 水浴。本实验

结果也表明,江西铅山红芽芋胚性愈伤组织玻璃化法超低温保存后适宜的解冻温度为 $40 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 水浴。

化冻后,由于 PVS2 的残留和毒性会影响材料的冻后再生,所以需要一定浓度的蔗糖溶液进行洗涤。洗涤时蔗糖浓度过高或过低都对材料的存活不利。蔗糖浓度过低,洗涤液的渗透压低于细胞,细胞就会吸水膨胀而受伤。反之,若蔗糖浓度过高,高渗透压溶液会使细胞发生质壁分离,降低细胞的存活率(李红民等, 2009)。玉米(周小梅等, 2001)、瓯柑(陈勇等, 2004)、欧洲七叶树(Lambardi *et al.*, 2005)、龙眼(郭玉琼等, 2006)和荔枝(郭玉琼等, 2007)胚性愈伤组织玻璃化法超低温保存后适宜的洗涤液蔗糖浓度均为 $1.2 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 蔗糖。本研究的结果表明,江西铅山红芽芋胚性愈伤组织化冻后,用 $\text{MS}+1.2 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 蔗糖洗涤也可显著提高材料的成活率。

恢复培养初期进行一定时间的暗培养至关重要。冻后培养时,先给材料一定时间的暗培养再转入正常的光周期中培养,可显著提高材料的成活率。因为黑暗培养可在一定程度上修复超低温保存伤害,有利于细胞组织的恢复生长,而直接置于光周期中不利于冻害细胞组织的恢复,甚至可能有加重细胞损伤的趋势(Hong *et al.*, 2012b)。欧洲七叶树(Lambardi *et al.*, 2005)和匍匐翦股颖(李红民等, 2009)胚性愈伤组织玻璃化法超低温保存后放在黑暗中培养生长,均可显著提高其细胞存活力。本研究表明江西铅山红芽芋胚性愈伤组织化冻洗涤后,先暗培养 7 d 再置于正常的光周期下培养,成活率显著提高。

此外,对玻璃化法超低温保存后的再生苗的遗传稳定性进行检测也很重要。本研究表明,红芽芋胚性愈伤组织冻后再生苗与未冻后再生苗在形态指标、生理指标和染色体数目上均无显著性差异。因此,江西铅山红芽芋胚性愈伤组织的玻璃化法超低温保存可保证其遗传稳定性。当然,如何从分子水平上去检测其遗传稳定性还需进一步研究。

参考文献:

- Chen Y (陈勇), Chen XT(陈娴婷), Wang JH(王君晖). 2004. Studies of cryopreservation of callus of *Citrus suavisissima* Hort. *et Tanaka* by vitrification (瓯柑愈伤组织的玻璃化法超低温保存研究)[J]. *J Zhejiang Univ: Sci Edit* (浙江大学学报·理学版), **31**(2): 197-201
- Cheng XX(程昕昕), Liu Z(刘正). 2013. Physiological effects of manganese on the germination of sweet corn(Mn^{2+} 对甜玉米种

- 子萌发生理效应的研究)[J]. *Guihaia* (广西植物), **33**(2): 159—163
- Guo YQ(郭玉琼), Lai ZX(赖钟雄), Lü LX(吕柳新). 2006. Preliminary study on cryopreservation of longan calli by vitrification (玻璃化法超低温保存龙眼胚性愈伤组织的初步探)[J]. *J Fujian Agric For Univ; Nat Sci Edit* (福建农林大学学报·自然科学版), **35**(3): 262—265
- Guo YQ(郭玉琼), Lai ZX(赖钟雄), Lü LX(吕柳新). 2007. Cryopreservation of embryogenic calli by vitrification and plant regeneration via somatic embryogenesis in litchi(玻璃化法超低温保存荔枝胚性愈伤组织及其植株再生)[J]. *J Fujian Agric For Univ; Nat Sci Edit* (福建农林大学学报·自然科学版), **36**(1): 34—37
- Guzmán-García E, Bradai F, Sánchez-Romero C. 2013. Cryo preservation of avocado embryogenic cultures using the droplet-vitrification method[J]. *Acta Physiol Plant*, **35**(1): 183—193
- Hong SR, Yin MH. 2012a. A simple and efficient procedure for cryo preservation of embryogenic calli of medicinal plant *Anemarrhena asphodeloides* Bunge by vitrification[J]. *Plant Cell, Tissue Organ Culture*, **109**(2): 287—296
- Hong SR Yin MH. 2012b. High-efficiency encapsulation-vitrification protocols for cryo preservation of embryogenic calli of oriental medicinal plant *Anemarrhena asphodeloides* Bunge[J]. *Cryo letters*, **33**(3): 190—200
- Jiang ST(姜绍通), Cheng YZ(程元珍), Zheng Z(郑志), et al. 2012. Analysis and evaluation of nutritional components of red bud taro(*Colocasia esulenta* L. Schott)(红芽芋营养成分分析及评价)[J]. *Food Sci* (食品科学), **33**(11): 269—272
- Kong H(孔红). 2012. Karyotype diversity of six *Astragalus* species(黄芪属六种植物的核型多样性)[J]. *Guihaia* (广西植物), **32**(5): 579—582
- Lambardi M, De Carlo A, Capuana M. 2005. Cryopreservation of embryogenic callus of *Aesculus hippocastanum* L. by vitrification/one-step freezing[J]. *Cryo Letters*, **26**(3): 185—192
- Li HM(李红民), Ma HL(马晖玲). 2009. Cryopreservation of creeping bentgrass embryogenic callus by vitrification and its plant regeneration(玻璃化法超低温保存匍匐剪股颖胚性愈伤组织及其植株再生)[J]. *J Gansu Agric Univ* (甘肃农业大学学报), **44**(4): 62—66
- Li HJ(李火金). 2012. Tissue culture and cultivation of Yanshan red bud taro shoot tip virus-free plantlets(铅山红芽芋茎尖脱毒组培繁育及高产栽培)[J]. *Chin Veget* (中国蔬菜), (3): 45—46
- Li MJ(李明军), Hong SR(洪森荣), Xu X(徐鑫), et al. 2006. Cryopreservation technique of *Dioscorea opposita* Thunb. germplasm resources by vitrification(怀山药种质资源的玻璃化法超低温保存)[J]. *Acta Agron Sin* (作物学报), **32**(2): 288—292
- Li MJ(李明军), Zhou N(周娜), Liu J(刘杰), et al. 2008. Cryopreservation of *Rehmannia glutinosa* (Gaertn.) Libosch by vitrification and encapsulation-vitrification(怀地黄玻璃化和包埋玻璃化法超低温保存)[J]. *Acta Horti Sin* (园艺学报), **35**(4): 607—610
- Maslanka M, Panis B, Bach A. 2013. Cryopreservation of *Galanthus elwesii* Hook. apical meristems by droplet vitrification[J]. *Cryo Letters*, **34**(1): 1—9
- Wang G(王高), Fan XL(范现丽), Shen XH(申晓辉), et al. 2009. Cryopreservation of korean pine somatic calli(红松胚性愈伤组织的超低温保存技术)[J]. *J Shanghai Jiaotong Univ; Agric Sci Edit* (上海交通大学学报·农业科学版), **27**(3): 223—225, 230
- Wang YJ(王艳军), Li XX(李锡香), Xiang CP(向长萍), et al. 2005. Studies on cryopreservation technology of shoot-tips of garlic by vitrification(大蒜茎尖玻璃化法超低温保存技术研究)[J]. *Acta Horti Sin* (园艺学报), **32**(3): 507—509
- Wu CJ(吴才君), Fan SY(范淑英), Jiang YH(蒋育华), et al. 2004. Inducing gathering effect of taro on *Spodoptera litura* Fabricius(芋对斜纹夜蛾的诱集作用)[J]. *Chin J Ecol* (生态学杂志), **23**(4): 172—174
- Xiao YS(肖月士). 2006. Red bud taro nuisanceless high yield cultivation technique(红芽芋无公害高产栽培技术)[J]. *Crops* (作物杂志), (2): 55—56
- Xu GH(徐国环), Xu MQ(许满庆). 2008. Red bud taro-rice-vegetable efficient planting technology(红芽芋—稻—菜高效种植技术)[J]. *Chin Seed Ind* (中国种业), (2): 66—67
- Zhang YQ(张玉芹), Li XX(李锡香), Ma Q(马庆), et al. 2004. Preliminary study on vitrification cryopreservation technology of edible lily germplasm(食用百合种质的玻璃化法超低温保存技术初探)[J]. *Chin Veget* (中国蔬菜), (4): 11—13
- Zheng JP(郑建平). 2010. High-yield cultivation techniques of red bud taro(红芽芋的高产栽培技术)[J]. *Xiandai Horti* (现代园艺), (7): 29—30
- Zhou XM(周小梅), Wang GY(王国英), Ao GM(敖光明), et al. 2001. Cryopreservation of maize immature embryos, embryogenic callus and cell suspension cultures by vitrification(玉米组培材料的玻璃化法超低温保存及冻后植株再生)[J]. *J Agric Biotechnol* (农业生物技术学报), **9**(4): 355—358